

ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА Cu^{2+} -ОПОСРЕДОВАННОЕ ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ГЛИЦЕРОФОСФАТА

Е. М. Овсянникова

Белорусский государственный университет, Минск;

oekaterina6666@gmail.com;

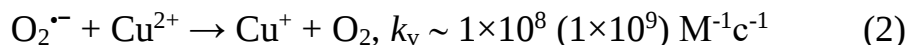
науч. рук. – И. Л. Юркова, д-р хим. наук, проф.

Изучено влияние N-ацетилцистеина (АЦЦ) на Cu^{2+} -опосредованную фрагментацию глицеро-2-фосфата с разрывом фосфоэфирной связи без добавок и в присутствии аскорбиновой кислоты. Установлено, что АЦЦ без добавок активирует процесс, в присутствии аскорбата обнаруживает антиоксидантный эффект.

Ключевые слова: N-ацетилцистеин, глицерофосфат, ион Cu^{2+} , гидроксильный радикал, свободнорадикальная фрагментация.

ВВЕДЕНИЕ

В биосистемах ионы меди могут катализировать образование гидроксильных радикалов в соответствии с реакциями [1]:



Фосфоэфиры глицерина (глицеро-1-фосфат, глицеро-2-фосфат) содержат в себе фрагменты структуры глицерофосфолипидов и могут являться их модельными соединениями. Радикалы $\text{HO}^\bullet$ инициируют свободнорадикальную деструкцию глицерофосфатов с разрывом фосфоэфирной связи в их молекулах, которая протекает преимущественно за счет реакции фрагментации первичных радикалов $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})-\text{C}^\bullet(\text{OH})-\text{H}_2\text{C}-\text{OP}(\text{O})(\text{O}_2\text{H})^-$ и $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})-\text{HC}(\text{OP}(\text{O})(\text{O}_2\text{H})^-)-\text{C}^\bullet\text{H}(\text{OH})$ $\{\text{HC}^\bullet(\text{OH})-\text{HC}(\text{OP}(\text{O})(\text{O}_2\text{H})^-)-\text{CH}_2(\text{OH})\}$ [2] (рисунок 1):

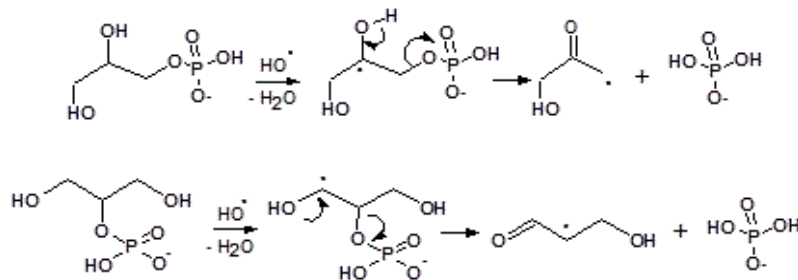


Рис. 1.

Свободнорадикальное дефосфорилирование глицеро-1-фосфата и глицеро-2-фосфата протекает с высокой скоростью ($k_v > 10^6 \text{ с}^{-1}$) [2] и моделирует процесс деструкции глицерофосфолипидов с разрывом фосфоэфирной связи в полярной части биомембран через стадию образования радикалов $\text{H}_2\text{C}(\text{OR}_1)-\text{C}^*(\text{OH})-\text{H}_2\text{C}-\text{OP}(\text{O})\text{O}_2\text{R}_2$ [1].

N-ацетилцистеин (АЦЦ) – широко известное лекарство, обладающее муколитическим действием, его также используют в качестве химиопрофилактического средства против рака [3]. Широко изучается действие АЦЦ на пероксидное окисление глицерофосфолипидов, протекающее в их гидрофобном фрагменте. Роль АЦЦ в регулировании гомолитической деструкции, которая может протекать в их полярной части [1], не изучена. Эффект АЦЦ на свободнорадикальные процессы биомолекул не однозначен, он может быть как анти-, так и прооксидантным [3].

Целью данной работы было изучение влияния N-ацетилцистеина на Cu^{2+} -опосредованную фрагментацию глицеро-2-фосфата с разрывом фосфоэфирной связи без добавок и в присутствии аскорбиновой кислоты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали N-ацетил-L-цистеин, глицеро-2-фосфат (ГФ) от фирмы «Sigma-Aldrich» (Deisenhofen, Германия), аскорбиновая кислота (Аск), гидропероксид, соли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ были получены от ЗАО «Вектон» (Россия). Водные растворы готовили на деионизированной воде. Химическое инициирование свободнорадикальных процессов осуществляли с помощью редокс-системы $\text{Cu}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$, генерирующей радикалы $\text{HO}^\cdot$. К растворам ГФ добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и H_2O_2 , конечная концентрация которых указана в подписи к рисунку. Тестируемые вещества вводили в раствор субстрата до добавления компонентов редокс-систем. Образцы тщательно перемешивали после добавления каждого реагента и далее термостатировали при температуре 37°C . Свободнорадикальную фрагментацию ГФ оценивали по образованию молекулярного продукта – неорганического фосфата. Фосфат-анион в растворах ГФ (рН 7,0) определяли фотоколориметрически по модифицированной методике, изложенной в [4]. В основе анализа использована цветная реакция фосфат-аниона с молибдатом аммония. Процедура анализа была следующая: к 0,2 мл исследуемой пробы добавляли 1 мл воды, 1 мл раствора $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ (1,8 % раствор в 2 N H_2SO_4) и 0,2 мл раствора FeSO_4 (10 % раствор в 0,15 N H_2SO_4). Полученный раствор фотометрировали относительно холостой пробы при длине волны,

равной 720 нм. Концентрацию фосфат-аниона, как продукта свободнорадикальных превращений ГФ, рассчитывали по калибровочной кривой. Для обработки полученных экспериментальных результатов применяли методы математической статистики, включая встроенные в компьютер статистические функции программы «Origin». Достоверность полученных результатов контролировали с помощью t-теста Стьюдента. В каждой экспериментальной серии проводили 3-5 параллельных опытов. На рисунках каждый результат представлен как среднее значение $\pm$ SD, статистически отличное в сравнении с контролем ($P < 0,05$).

При исследовании влияния АЦЦ в диапазоне концентраций 0,25-10,0 мМ на дефосфорилирование ГФ в условиях Cu^{2+} -опосредованного генерирования радикалов $\text{HO}^\bullet$ выявлено, что аминокислота не обладает протекторной активностью в регулировании процесса (рис. 2-а). Повышение количества АЦЦ в системе сопровождается активацией фрагментации ГФ.

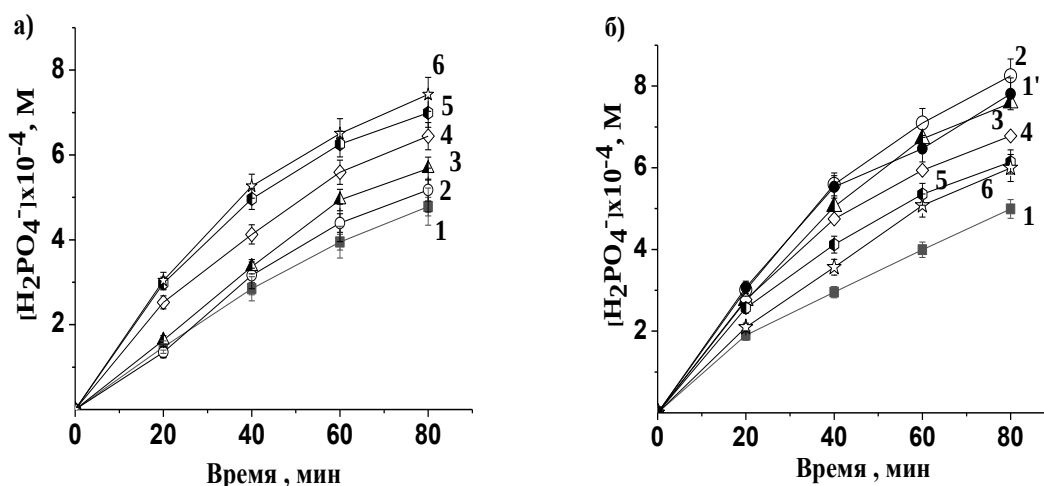


Рис. 2. Накопление H_2PO_4^- в 50 мМ растворе ГФ, инкубированном при 37 °С с $\text{CuSO}_4\text{--H}_2\text{O}_2$ (0,25/15,0 мМ), содержащем АЦЦ без добавок (а) и в присутствии 0,5 мМ аскорбата (б): 1 – 0; 1' – 0 + Аск; 2 – 0,25; 3 – 0,5; 4 – 1,0; 5 – 5,0; 6 – 10,0 мМ

Известно, что АЦЦ обладает высокой реакционной способностью по отношению к радикалам $\text{HO}^\bullet$ ($k_{\text{vHO}^\bullet} = 1,36 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Можно было бы ожидать, что АЦЦ будет акцептировать $\text{HO}^\bullet$ и тем самым препятствовать их атаке на молекулы ГФ. Однако в условиях нашего эксперимента АЦЦ служит промотором фрагментации ГФ. Такой прооксидантный эффект АЦЦ можно объяснить его взаимодействием с ионами меди. АЦЦ вероятно координирует ионы Cu^{2+} (к. ч 4 или 6) таким образом, что это способствует их восстановлению до Cu^+ (к. ч 2 или 4) в реакциях (1, 2). Это в свою очередь будет содействовать протеканию реакции (3) и повышению уровня $\text{HO}^\bullet$.

АЦЦ в качестве химиопрофилактического средства часто применяют в комбинации с аскорбиновой кислотой [5]. Поэтому в работе также исследовали действие АЦЦ в присутствии Аск. Предварительно изучали эффект Аск на Cu^{2+} -опосредованную фрагментацию ГФ без добавок АЦЦ. Аск интенсифицировала процесс (рис. 2-б, линии 1 и 1'), что можно объяснить ее способностью усиливать потенциал редокс-системы $\text{CuSO}_4\text{--H}_2\text{O}_2$ генерировать $\text{HO}^\bullet$ вследствие восстановления Cu^{2+} до Cu^+ . В присутствии Аск влияние АЦЦ на фрагментацию ГФ отличалось от его эффекта без добавок (рис. 1-а). АЦЦ в смеси с Аск оказывал антиоксидантное действие, которое усиливалось с ростом его концентрации в системе. В присутствии Аск вероятно доля АЦЦ, участвующая в восстановлении Cu^{2+} снижается и в большей степени проявляются его $\text{HO}^\bullet$ -акцепторные свойства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях Cu^{2+} -опосредованного генерирования радикалов $\text{HO}^\bullet$ влияние АЦЦ на гомолитическое дефосфорилирование глицерофосфата было прооксидантным. В присутствии аскорбата эффект АЦЦ претерпевал инверсию, он ингибировал процесс в концентрационно-зависимой манере.

Полученные результаты важны для понимания молекулярных механизмов действия N-ацетилцистеина в регулировании свободнорадикальных процессов в клетке.

Библиографический список

1. Юркова И.Л. Свободнорадикальные реакции глицеро- и сфинголипидов / И.Л. Юркова // Успехи химии. – 2012. – Т. 81, № 2. – С. 175–190.
2. Schuchmann M.N. Reaction of Hydroxyl Radicals with Alkyl Phosphates and the Oxidation of Phosphatoalkyl Radicals by Nitro Compounds / M.N. Schuchmann, M.L. Scholes, H. Zegota, C. von Sonntag // Int. J. Radiat. Biol. – 1995. – Vol. 68, № 2. – P. 121–131.
3. Oikawa S. N-acetylcysteine, a cancer chemopreventive agent, causes oxidative damage to cellular and isolated DNA / S. Oikawa, K. Yamada, N. Yamashita, S. Tada-Oikawa, S. Kawanishi // Carcinogenesis. – 1999. – Vol. 20. – P.1485–1490.
4. Gin F. J., Morales F. Application of one-step procedure of measurement of inorganic phosphate in the presence of proteins actomyosin ATPase System // Anal. Biochem. – 1977. – Vol. 77, № 1. – P. 10–18.
5. D'Agostini F. Interactions between N-acetylcysteine and ascorbic acid in modulating mutagenesis and carcinogenesis / F. D'Agostini, R.M. Balansky, A. Camoirano, S. de Flora // Int. J. Cancer. – 2000. – Vol. 88. – P. 702–707.
6. Благодарность: работа поддержана ГПНИ Республики Беларусь «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганическая химия» (проект 2.2.03.04), Министерством образования РБ (грант 772/46).